

## 審査の結果の要旨

氏名 高橋範夫

リンパ系組織は悪性腫瘍転移経路やリンパ流の障害によるリンパ浮腫のような難治性の臨床症状に關与する。これらの予防・治療法確立のためにはリンパ管に関する研究が重要である。本研究はラット腸骨輸出、輸入リンパ管、そして輸出入リンパ管を採取後に生じ得る再開通リンパ管を採取し、その内皮細胞 (Lymphatic Endothelial Cell、以下 LEC) の培養及び輸出、輸入リンパ管、再開通リンパ管由来 3 種の LEC の比較検討を行い、下記の結果を得ている。

1. ラット左右腸骨リンパ管切除 2-3 週後では、リンパ管の再開通はみられなかった。切除 4-10 週後では、リンパ管の再開通がみられた。切除 4 週後のラットでは、8 個体中 2 個体、切除 5 週後のラットでは、8 個体中 1 個体が右側リンパ管の再開通がみられたが、その他のラットでは全て左側リンパ管の再開通がみられた。切除 6-10 週後のラットでも同様な傾向であった。ラット左右腸骨リンパ管切除後のリンパ管の再開通実験に用いた全ラット 34 個体中、4~10 週間後に再開腹したラット 28 個体は左側リンパ管再開通 24 個体、右側リンパ管再開通 4 個体であり (左側 86%、右側 14%) 有意に片測での観察可能なリンパ管再開通像がみられた。
2. リンパ管の内皮から細胞を採取し、培養した。培養第 3 継代の輸入、輸出、再開通リンパ管由来培養ラットリンパ管内皮細胞 (rat LEC、以下 rLEC) を抗 Prox-1 抗体にて免疫染色し、Prox-1 の発現を確認した。さらに RT-PCR により VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1 の発現を確認した。VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1 はリンパ管内皮細胞特異的マーカーにて、リンパ管から採取し培養した細胞はリンパ管内皮細胞であることが明らかになった。
3. 輸出、輸入、再開通リンパ管由来 rLEC の増殖能は MTS assay を用い、培養 24 時間後の吸光度を基準とし、培養 48, 72 時間後の吸光度との比である MTS スコアで評価した。その結果、輸出、輸入リンパ管由来 rLEC 間の MTS スコアには有意な差異は見られなかったが、再開通リンパ管由来 rLEC の培養 48, 72 時間での MTS スコアは他の 2 者と比較して統計学的に有意に高かった。この結果は再開通リンパ管由来 rLEC の増殖能は既存リンパ管由来 rLEC より有意に高いことを示すものである。
4. 輸出、輸入、再開通リンパ管由来 rLEC 培養皿に対して、ピペットチップによるスクラッチを付けた後 0, 48, 96, 144 時間の wound healing assay にて rLEC の遊走能を評価した。顕微鏡画像を用い、経時的に遊走距離を測定した結果、遊走能については輸出、輸入、再開通リンパ管由来の rLEC 間では有意な差異は見られなかった。
5. 輸出、輸入、再開通リンパ管由来 rLEC の浸潤能 (% invasion) は invasion assay を用い実験開始 72 時間後においてマトリゲルの無い膜を通過した細胞数に対してマトリゲル

膜を通過した細胞数の比として測定した。このパラメーターは rLEC の浸潤能を反映する。その結果、浸潤能については輸出、輸入、再開通リンパ管由来の rLEC 間では有意な差異は見られなかった。

本論文は、これら実験結果と先行研究より、ある個体が広範囲にリンパ管の損傷が生じた場合、既存の細いリンパ管が増殖能を増し、ある期間内に代償しうるリンパ管を形成し、両側を同時期に再生させるより、まずは緊急に片側を開通させ、リンパ循環動態を回復させることが、生体にとって合目的性があるということを明らかにした。本研究の新奇性の高い事項として、ラット輸入、輸出、再開通リンパ管と考えられる脈管を採取し、その内皮細胞の培養を行い、VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1 という 3 種の LEC の特異マーカー発現を解析し、再開通した脈管がリンパ管であると示したこと、さらに輸出、輸入、再開通リンパ管由来 3 種の rLEC の増殖能、遊走能、浸潤能を比較検討し、機能解析を行ったことが挙げられる。

以上本論文は、悪性腫瘍転移に対してはリンパ組織を萎縮させ転移を妨げ、リンパ浮腫に対してはリンパ路を増幅し浮腫を軽減しうる治療法に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。